

## Características especiales de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)

A. González-Sama, T. Coba de la Peña, F. Redondo Vela, N. de María, L. Guasch, E. Fedorova, C. de Lorenzo, M. J. Hernández-Jiménez, J.M. Pozuelo\*\*, M. P. Golvano, M. R. de Felipe, J. J. Pueyo\*, M. Fernández-Pascual\*, y M. M. Lucas\*

Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C., Madrid

### Resumen

Las leguminosas del género *Lupinus* establecen simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium* en nódulos indeterminados de tipo lupinoide. En este trabajo se describen el proceso de infección y el desarrollo del primordio nodular, que presentan características poco frecuentes. La infección tiene lugar vía intercelular. Las bacterias invaden la célula subepidérmica bajo el pelo radical, y mediante sucesivas divisiones de las células infectadas y las células no infectadas que las rodean se forma el primordio nodular. La división de las células infectadas es una característica de estos nódulos. Glicoproteínas, MAP-quinasas, aldehído oxidasas, citoesqueleto y genes como el inhibidor mitótico *ccs52A* están implicados en las etapas iniciales de nodulación y en el desarrollo de los nódulos. Además, se detallan aspectos estructurales y funcionales que caracterizan a los nódulos de altramuza, como son la peculiar corteza y la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno. Así mismo, se describe la presencia de la actividad óxido nítrico sintasa, las alteraciones producidas durante la senescencia nodular y la tolerancia de esta simbiosis a diferentes estreses abióticos.

### Índice

- I. Introducción
- II. El nódulo de *Lupinus*
- III. Infección y morfogénesis del nódulo siguen patrones inusuales
  - 1. Colonización de la superficie de la raíz e infección de las células corticales
  - 2. Formación del primordio nodular
  - 3. Glicoproteínas implicadas en el desarrollo nodular
  - 4. Proceso de endopoliploidización e implicación del gen *ccs52A*
  - 5. Activación de MAPKs en la infección
  - 6. Presencia de aldehído oxidasa y síntesis de ácido indolacético en el meristemo nodular
- IV. Características funcionales del nódulo
  - 1. Regulación de la concentración de oxígeno
    - a) Leghemoglobina
    - b) Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno con características especiales
  - 2. Actividad óxido nítrico sintasa en nódulos
- V. Senescencia nodular
  - 1. Alteraciones ultraestructurales
  - 2. Antioxidantes y proteínas relacionadas
- VI. Tolerancia de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* a estreses abióticos
- VII. Bibliografía recomendada

---

\* Estos autores han contribuido por igual en este trabajo.

\*\* *In memoriam*

## I. Introducción

Las leguminosas del género *Lupinus*, conocidas como altramuz o lupino, poseen gran potencial en la alimentación humana y animal, debido al alto contenido proteico de sus semillas (30-50 %). Además, es de notable importancia en la recuperación de suelos degradados, debido al efecto positivo sobre la fertilidad de éstos. Posee una serie de características, tales como la capacidad para solubilizar y absorber elementos del suelo gracias a su sistema radical extensivo, y la supervivencia en suelos con escasez de agua, pobreza en nutrientes y acidez alta, que le confieren singularidad respecto al resto de leguminosas grano cultivadas en climas templados. *Lupinus* es una de las pocas leguminosas que no forma micorrizas, y la absorción de fósforo en suelos con bajo contenido en este elemento, se produce gracias a un sistema de raíces proteoides.

Entre las especies de este género, *L. albus* es la mejor adaptada a suelos de acidez alta y pobreza de nutrientes; la variedad Multolupa es la de mayor resistencia a bajas temperaturas, soportando hasta -6° C. Se ha demostrado que en régimen de secano, en suelos ácidos y con bajo contenido de fósforo asimilable, se pueden alcanzar producciones de 2.800 kg/ha. Además, *Lupinus* puede considerarse una de las leguminosas cultivadas con mayor tolerancia a diferentes estreses abióticos, como nitrato, salinidad, sequía y encharcamiento. También puede acumular en sus raíces metales como Cd, Hg, Pb, Zn y Cr, lo que le hace ser una potencial fitorremediadora de sistemas contaminados.

Las especies del género *Lupinus* establecen simbiosis con el rizobio de crecimiento lento *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Se considera una de las simbiosis más efectivas, y se ha estimado en 102-252 kg/ha la cantidad total de nitrógeno fijado por campaña agrícola. La nodulación de las leguminosas es un proceso extensamente estudiado desde hace más de un siglo. Sin embargo, todavía existen aspectos básicos desconocidos de la simbiosis de algunas leguminosas, incluso aunque estas hayan sido cultivadas desde tiempos ancestrales, como es el caso del altramuz. Así, las etapas tempranas de la nodulación y el modo de infección e invasión en esta leguminosa no han sido descritas hasta muy recientemente. Este grupo de investigación, mediante la utilización de técnicas de microscopía, fisiología, bioquímica, y biología molecular ha llevado a cabo estudios de estructura-función del nódulo de *L. albus*, cuyos resultados más relevantes se presentan en esta revisión.

## II. El nódulo de *Lupinus*

Los nódulos de *Lupinus* son de crecimiento indeterminado, y por tanto mantienen un meristemo activo. Sin embargo, no muestran las características típicas de los nódulos indeterminados: forma cilíndrica, meristemo apical, y en la zona infectada, un gradiente de diferenciación desde el meristemo hasta la base del nódulo. Por esta razón, se clasifican como un subtipo especial y único denominado nódulo lupinoide. En las etapas tempranas del desarrollo, el nódulo de altramuz crece en todas las direcciones adquiriendo una forma esférica, que recuerda a los nódulos determinados. En nódulos jóvenes el meristemo, constituido por células infectadas y no infectadas, se localiza rodeando a la zona infectada. Conforme el nódulo madura la zona meristemática queda circunscrita a la región basal-lateral, y el nódulo continúa creciendo, pudiendo rodear completamente a la raíz, momento en que cesa su desarrollo.

Los nódulos maduros de lupino están constituidos por una zona infectada y la corteza. Esta última presenta características estructurales únicas (ver IV.1.b). La región central nodular corresponde a la zona infectada y, a diferencia de la mayoría de los nódulos de leguminosas, está constituida exclusivamente por células infectadas. Los

simbiosomas del nódulo de *L. albus* generalmente contienen un escaso número de bacteroides, siendo frecuente encontrar un único bacteroide por simbiosoma.

La nodulación en altramuz posee características propias que lo diferencian de otras leguminosas. El proceso de la infección de las raíces difiere del que sucede en la mayoría de las leguminosas estudiadas, ya que no se produce a través de cordones de infección.

### III. Infección y morfogénesis del nódulo siguen patrones inusuales

Mediante la utilización combinada de diferentes tipos de microscopía (óptica, láser-confocal y electrónica), técnicas de inmunomarcado de bacterias y proteínas, y bacterias que expresan la proteína fluorescente verde (GFP: *Green Fluorescent Protein*), se ha demostrado que esta simbiosis posee características peculiares.

#### 1. Colonización de la superficie de la raíz e infección de las células corticales

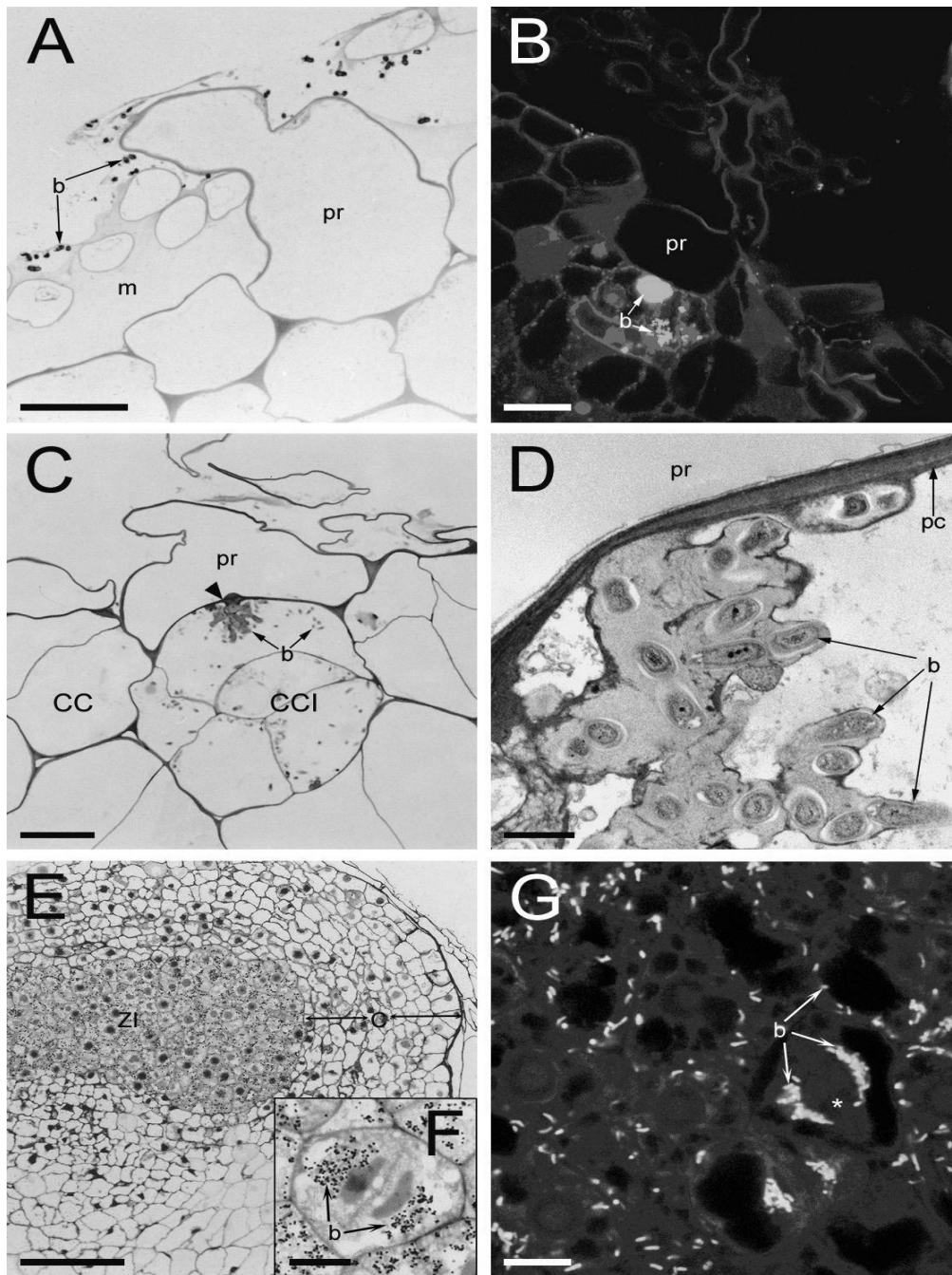
Las bacterias de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), atraídas por los exudados radicales, proliferan en la rizosfera y se adhieren a la superficie externa de las paredes de los pelos radicales y de las células epidérmicas. Cuatro días después de la inoculación, los rizobios aparecen inmersos en excreciones mucilaginosas de la raíz (Figura 1A), que contienen glicoproteínas identificadas con el anticuerpo monoclonal MAC265 (ver III.3). A continuación, los rizobios proliferan en las zonas de contacto entre los pelos radicales y las células epidérmicas. Estos lugares constituyen el punto de entrada de las bacterias al tejido cortical de la raíz. La infección se produce vía intercelular, y la invasión ocurre de manera localizada en una única célula situada bajo un pelo radical (Figura 1B). Los pelos radicales no presentan la deformación ni la curvatura características de la mayoría de interacciones simbióticas estudiadas; y tampoco se observan en ellos canales de infección.

Tras la colonización se inician las primeras divisiones de las células de la corteza externa de la raíz, situadas inmediatamente debajo de la epidermis. La invasión de la célula cortical localizada debajo del pelo radical se produce a través de regiones de la pared celular alteradas estructuralmente (Figura 1C y 1D).

#### 2. Formación del primordio nodular

La célula cortical inicialmente infectada se divide repetidamente y las bacterias son distribuidas entre las células hijas. Éstas contienen un escaso número de bacterias y aparecen confinadas dentro de la pared celular de la célula cortical de la que derivan (Figura 1D). Las células corticales circundantes no infectadas se dividen simultáneamente. En una fase más avanzada, el primordio nodular presenta dos zonas claramente diferenciadas. La zona central, que dará lugar a la zona infectada del nódulo, contiene únicamente células infectadas en diferentes estadios de división. (Figura 1E). En cada ciclo de división, se produce una reorganización intracelular de los rizobios y un reparto aparentemente equitativo entre las células hijas (Figura 1F y 1G). Los rizobios se posicionan de manera que no interfieren en la división celular. La reorganización de los elementos del citoesqueleto en estas células presenta patrones semejantes a los de cualquier célula vegetal en división. Rodeando a la zona infectada, se encuentran células no infectadas en división (Figura 1E), que darán lugar a la corteza del nódulo.

La división de las células infectadas constituye una peculiaridad que diferencia el desarrollo del nódulo de *Lupinus* de la mayoría de los nódulos estudiados.



**Figura 1.** Proceso de infección y desarrollo del nódulo de *Lupinus albus*. **A)** Colonización de la raíz por *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*); bacterias inmunomarcadas. **B)** Imagen de microscopía láser confocal que muestra la acumulación bacteriana en la célula bajo el pelo radical. **C)** Infección de la célula cortical subepidérmica a través de una región alterada de la pared celular (punta de flecha). **D)** Detalle al microscopio electrónico de la zona de infección de C. **E)** Sección de un primordio nodular de 11 días con bacterias inmunomarcadas. **F)** Detalle de una célula infectada recién dividida. **G)** Zona infectada al microscopio confocal mostrando una célula recién dividida (\*). b: bacterias, C: corteza nodular, CC: célula cortical, CCI: célula cortical infectada, m: mucilago, pc: pared celular, pr: pelo radical, ZI: zona infectada. Barras A, F y G: 10 µm; B y E: 100 µm; C: 20 µm; D: 2 µm.

### 3. Glicoproteínas implicadas en el desarrollo nodular

Los anticuerpos monoclonales MAC236 y MAC265 reconocen epítomos de naturaleza glicoproteica (tipo extensina) en la matriz de los canales de infección de las leguminosas. Dichos anticuerpos reaccionan, en los nódulos de altramuza, con dos polipéptidos de peso molecular diferente a los que reconocen en nódulos de otras leguminosas. MAC236 reconoce en lupino un polipéptido de 240 kDa, que aumenta con el desarrollo del nódulo y MAC265 reacciona con un polipéptido de 135 kDa que no varía durante dicho desarrollo. Estudios de inmunolocalización con estos anticuerpos reflejan diferencias entre ambos epítomos durante el desarrollo del nódulo de lupino. Los dos epítomos se localizan en el primordio nodular de modo preferencial, aunque predomina el reconocido por MAC265. Este también se encuentra en la rizosfera, en la proximidad de los pelos radicales, y en los espacios intercelulares de las células corticales de la raíz. Estudios de microscopía electrónica revelaron el inmunomarcado de abundantes vesículas y cisternas del aparato de Golgi. En el nódulo maduro ambos epítomos se localizan en la matriz de los espacios intercelulares de la corteza media, pero existen algunas diferencias en la localización intracelular. El epítomo reconocido por MAC265 se encuentra en vesículas, mientras que el de MAC236 se localiza en unas estructuras lobulares anejas a la pared celular de los espacios intercelulares, que podrían constituir depósitos de glicoproteínas durante el desarrollo del nódulo.

### 4. Proceso de endopoliploidización e implicación del gen *ccs52A*

Otro aspecto interesante del nódulo de *Lupinus*, aunque no exclusivo, es la progresiva endopoliploidización que se produce durante su desarrollo. Este aumento de la ploidía se produce por endoreduplicación, proceso en el cual tienen lugar varios ciclos consecutivos de replicación del ADN nuclear y de crecimiento celular sin la subsiguiente división de la célula. El resultado es la generación de grandes células poliploides que pueden albergar un gran número de bacterias. La endopoliploidización parece ser un proceso general del desarrollo nodular, que es más acusado en unas especies de leguminosas que en otras. En el nódulo indeterminado de *Medicago*, la endoreduplicación se produce en las zonas meristemática y de invasión, y está regulada por el producto del gen *ccs52A* (de *cell cycle switch*), que actúa como un inhibidor de la mitosis. En *L. albus*, se ha identificado un homólogo de *ccs52A*. La expresión del gen comienza a detectarse en las etapas más iniciales del desarrollo cuando el primordio nodular está constituido por un pequeño número de células infectadas. En nódulos jóvenes, la expresión queda restringida a la capa de células más interna de la corteza.

### 5. Activación de MAPKs en la infección

La cascada de las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), tanto en mamíferos como plantas, es una de las vías más importantes mediante la cual los estímulos extracelulares son transducidos en una respuesta intracelular. Las MAPKs están implicadas en la regulación del ciclo celular, en la acción hormonal y en la respuesta de la planta a diversos estreses y patógenos.

MAPKs pueden mediar en los procesos de infección por rizobios. La inoculación de *L. albus* con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) activa transitoriamente SIMK (*Salt stress-Inducible MAPK*) y SAMK (*Stress-Activated MAPK*). La inoculación de raíces con bacterias muertas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) o con *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti*, bacteria incapaz de nodular *Lupinus*, no tiene efecto en la activación de SIMK y SAMK. Estos datos indican que la activación de estas enzimas es una respuesta específica de las células de la leguminosa a la bacteria potencialmente simbiótica, y por

tanto puede conducir a una interacción simbiótica positiva. La utilización de inhibidores específicos de MAPKs produce un retraso en la nodulación, lo que sugiere que estas quinasas intervienen en procesos tempranos de la infección.

## **6. Presencia de aldehído oxidasa y síntesis de ácido indolacético en el meristemo nodular**

El enzima aldehído oxidasa (AO) cataliza la oxidación de aldehídos y compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno en animales y microorganismos. En plantas, interviene en la última etapa de la síntesis del ácido abscísico (ABA) y del ácido indolacético (AIA) vía indol-3-pirúvico. Las fitohormonas, como auxinas, actúan en la organogénesis de los nódulos de leguminosas, aunque su papel no está totalmente determinado. La acción de AIA se había relacionado con un bloqueo de su transporte en la raíz. Sin embargo, recientemente se ha demostrado, por primera vez, la presencia de un enzima de la síntesis de AIA en nódulos, y por tanto la potencial capacidad de síntesis de esta hormona.

Los nódulos de *L. albus*, inducidos por cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), poseen tres isoenzimas de AO. Sin embargo, los nódulos Fix<sup>-</sup>, de crecimiento restringido y senescencia prematura, inducidos por una cepa de *Mesorhizobium loti*, no parecen poseer AOs activas. Mediante el inmunomarcado de los tejidos con anticuerpos que reconocen AOs nodulares, se estudió la localización del enzima, por microscopía electrónica de transmisión, de fluorescencia y microscopía láser confocal. La proteína, que es citoplasmática, se localiza preferentemente en la zona meristemática lateral de los nódulos de altramuz, constituida por células no infectadas e infectadas en división. El análisis de expresión de *ao* mediante RT-PCR demostró que la expresión más alta se produce en los primordios nodulares y la más baja en nódulos Fix<sup>-</sup>. Los estudios de hibridación *in situ* mostraron un patrón de expresión altamente consistente con la distribución de la proteína. Además, el patrón de inmunolocalización de AIA fue semejante al encontrado para AO. Por el contrario, el inmunomarcado de ABA en los nódulos reveló que los niveles de esta hormona eran bajos y homogéneos en todas las zonas del nódulo. Estos resultados indican la capacidad de síntesis local de AIA en la zona meristemática del nódulo de altramuz, así como la posible implicación de AO en la organogénesis nodular y en la autorregulación del crecimiento y el desarrollo de los nódulos.

## **IV. Características funcionales del nódulo**

*Lupinus* es la única leguminosa de clima templado nodulada por bacterias del género *Bradyrhizobium* que transporta el nitrógeno fijado en forma de amidas.

### **1. Regulación de la concentración de oxígeno**

El nódulo es un órgano altamente especializado que reúne las condiciones microaeróbicas adecuadas para asegurar la fijación de nitrógeno mediante la actividad nitrogenasa. Por este motivo, la regulación de la concentración de oxígeno en los nódulos es un factor clave. El movimiento y la concentración de oxígeno en el nódulo se regulan por varios mecanismos entre los que se encuentran la presencia de leghemoglobina y la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno.

#### **a) Leghemoglobina**

La leghemoglobina constituye la nodulina más característica tanto cualitativa como cuantitativamente. Su función consiste en transportar y regular la concentración de oxígeno en el citoplasma de las células infectadas. Mediante inmunocitoquímica, se

demostró que la leghemoglobina se encuentra en el citoplasma de las células infectadas y en la membrana peribacteroidal que rodea a los bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). En los nódulos existe un espacio mínimo entre la membrana peribacteroidal y la membrana del bacteroide, como quedó demostrado en nódulos de *L. albus* criofijados mediante HPF (*High Pressure Freezing*). Por tanto, el oxígeno transportado por la leghemoglobina es liberado en la membrana peribacteroidal y directamente puede acceder a la membrana bacteroidal, donde se encuentra la cadena respiratoria bacteriana.

### **b) Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno con características especiales**

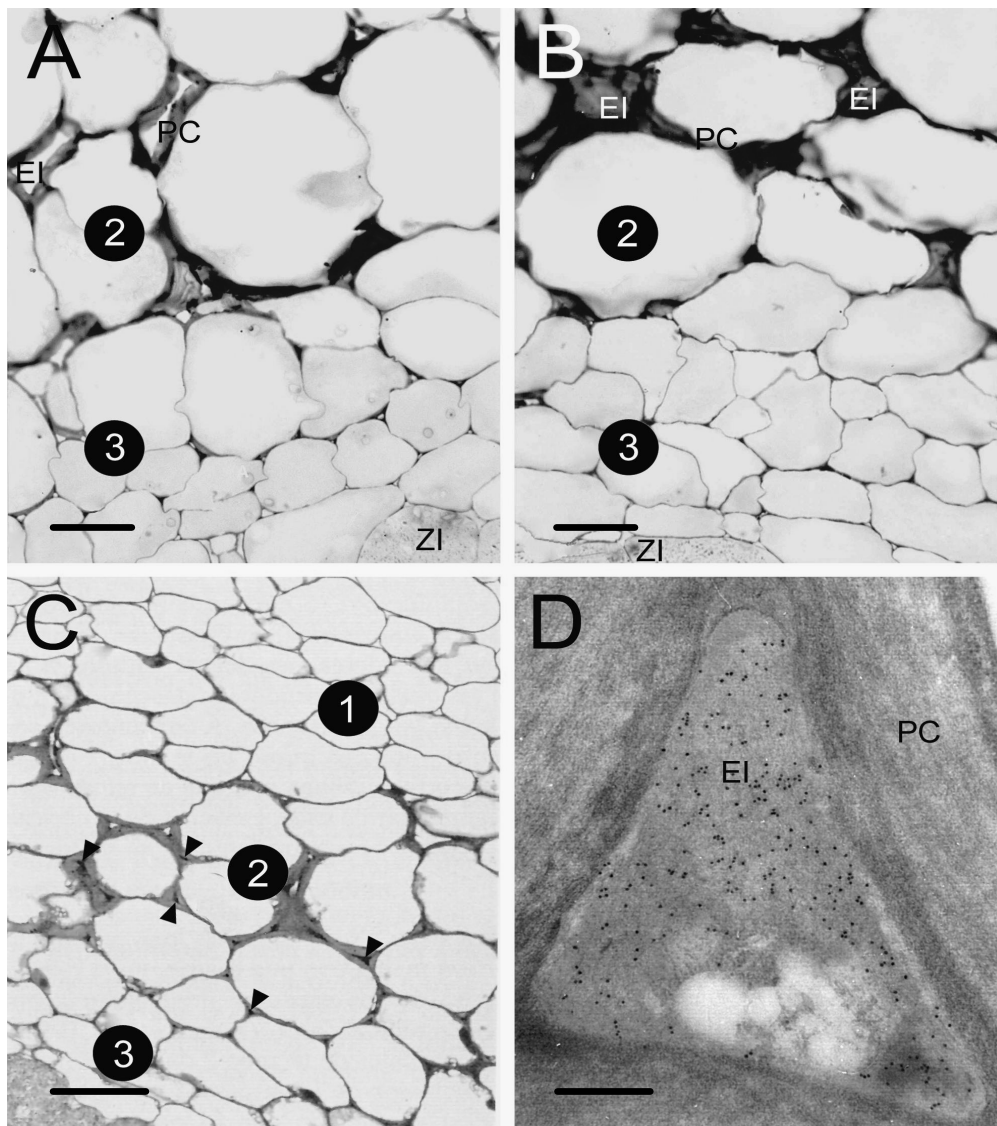
La existencia y funcionamiento de la barrera había sido puesta de manifiesto por técnicas fisiológicas, modelos matemáticos y la utilización de microelectrodos de oxígeno; pero la naturaleza, la localización precisa y el mecanismo de operación de la barrera en los nódulos se ha determinado por técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas. Concretamente, se empleó el nódulo de *Lupinus albus* ya que su corteza está muy bien estructurada, y la barrera responde a condiciones de estrés de forma más lenta que en otras leguminosas.

El oxígeno llega a los bacteroides desde el exterior a través de una red de espacios aéreos, los espacios intercelulares. En la corteza del nódulo de altramuz se distinguen tres zonas: la corteza externa (zona 1) formada por 5-6 capas de células grandes y poco empaquetadas, una zona claramente delimitada (zona 2) constituida por 2-3 capas de células grandes, con paredes engrosadas rodeando los espacios intercelulares, y más internamente y en contacto con la zona infectada, la zona 3, compuesta por células más pequeñas, muy empaquetadas y con espacios intercelulares reducidos. Las zonas 2 y 3 están implicadas en el funcionamiento de la barrera (Figura 2A y 2B), como se demostró al someter plantas noduladas a diferentes situaciones de estrés como nitrato, herbicidas y alta salinidad.

La alteración más evidente es la oclusión de los espacios de la zona 2 por una glicoproteína, que es reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC236. En los nódulos control, la glicoproteína se encuentra bordeando los espacios intercelulares de la zona 2. Sin embargo, en los nódulos de plantas tratadas con nitrato se produce la oclusión de estos espacios por la glicoproteína, con el consiguiente incremento de la resistencia a la difusión de oxígeno. Las zonas engrosadas son impermeables a los gases, por lo que la oclusión de los espacios le permite al nódulo una regulación muy precisa de la difusión del oxígeno, en función de las condiciones ambientales. El incremento de la resistencia a la difusión del oxígeno en el nódulo de *Lupinus* se basa en la reducción del tamaño de los espacios intercelulares, lo que se consigue mediante el aumento del volumen de las células corticales de la zona 2 y la oclusión de dichos espacios con la citada glicoproteína (Figura 2C y 2D).

La aplicación de diferentes presiones de oxígeno, superiores o inferiores a la atmosférica (1 % y 40 % de oxígeno), a plantas de *Lupinus* noduladas ha permitido estudiar el efecto de la limitación de oxígeno sobre la fijación de nitrógeno en situaciones de estrés, así como los cambios en la estructura de la corteza nodular y en la expresión del gen *enod2* (*early noduline*) involucrado en la regulación de la difusión de oxígeno.

En otras leguminosas, *enod2* parece codificar la glicoproteína responsable de la oclusión de los espacios intercelulares, dada su localización en el parénquima nodular y la secuencia codificante. La aplicación de técnicas de *Northern blot* e hibridación *in situ* con una sonda derivada de un fragmento del gen *enod 2* de *L. luteus* ha demostrado la influencia del oxígeno en la expresión del gen. El ARN mensajero de *enod 2* se localiza en el parénquima o corteza media donde se sitúa la barrera de resistencia al oxígeno. La



**Figura 2.** Alteraciones estructurales de la corteza del nódulo de *L. albus* durante el funcionamiento de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno e inmunolocalización de la glicoproteína. **A)** Barrera “abierta”. **B)** Barrera “cerrada”. Obsérvese la oclusión de los espacios intercelulares. **C)** Inmunolocalización seguida de “silver enhancement” de la glicoproteína reconocida por el anticuerpo MAC236 (puntas de flecha). **D)** Inmunomarcaje al MET de la glicoproteína en un espacio intercelular ocluido. EI: espacio intercelular, PC: pared celular, ZI: zona infectada. 1: corteza externa, 2: corteza media, 3: corteza interna. 1, 2, 3: zonas de la corteza. Barras A y B: 25  $\mu\text{m}$ , C: 50  $\mu\text{m}$ , D: 0,25  $\mu\text{m}$ .

localización es muy específica, y varía con la concentración de oxígeno aplicada, no encontrándose en otras estructuras del nódulo.

La expresión de *enod2* comienza a detectarse antes de la aparición de la actividad nitrogenasa. Con respecto a la expresión de genes implicados en la regulación de la difusión de oxígeno, el notable incremento del ARN mensajero del gen *enod2* con la



aplicación de 40 % oxígeno al sistema radicular durante 3 días coincide con el aumento de la resistencia mínima, lo que parece confirmar su papel en la difusión de oxígeno a medio plazo, mientras que a más largo plazo los cambios bioquímicos y genéticos ceden protagonismo a los estructurales. El mensajero de leghemoglobina desciende de forma apreciable a partir del tercer día, lo que está en concordancia con su papel regulador en el bloqueo de la difusión facilitada. Mientras que la expresión de *nifH*, perteneciente al simbionte, no se ve alterada por los tratamientos aplicados. Esto demuestra la capacidad de adaptación de los nódulos de lupino a altas concentraciones de oxígeno debido a la sucesión de modificaciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales producidas en los mecanismos de difusión de O<sub>2</sub> dentro del nódulo.

## 2. Actividad óxido nítrico sintasa en nódulos

El enzima óxido nítrico sintasa (NOS), produce óxido nítrico y citrulina a partir del aminoácido L-arginina. El óxido nítrico (NO) juega un importante papel en la fisiología animal, actuando en los mecanismos de transducción de señales o como agente citostático o citotóxico, dependiendo del tipo y origen del enzima.

Por primera vez se ha demostrado la existencia de este sistema enzimático en plantas, concretamente en *L. albus*. Esta actividad NOS colocaliza con NADPH-diaforasa en los haces vasculares de raíces y nódulos y en las células infectadas del nódulo. En estos órganos también se ha confirmado la síntesis de NO y de L-<sup>14</sup>C-citrulina de una manera dependiente de L-<sup>14</sup>C-arginina. La síntesis de L-<sup>14</sup>C-citrulina es inhibida competitivamente por N-monometil arginina, un antagonista e inhibidor de la NOS en células animales. Estos estudios avalan la tesis de que la síntesis de NO es una antigua vía biológica en la evolución eucariota y demuestran la conservación de los sistemas de transducción de señales entre el reino animal y vegetal.

Se desconoce el significado biológico de la síntesis de NO en los nódulos. Cambios en la actividad o en la forma de NOS pueden tener un gran interés puesto que las proteínas más importantes del nódulo, nitrogenasa y leghemoglobina, son capaces de unirse a NO afectando de alguna manera su función en la fijación de nitrógeno.

## V. Senescencia nodular

Después de la etapa de madurez del nódulo sobreviene la senescencia, proceso gradual, que en altramuza, al contrario de lo que sucede en otras leguminosas, se desencadena independientemente del estado fenológico de la planta. Debido al peculiar modo de infección y desarrollo de los nódulos de lupino, la senescencia se inicia en la zona central y se extiende al resto del nódulo, de manera semejante a como sucede en nódulos determinados. La corteza del nódulo parece entrar en el proceso un tiempo después que la zona infectada.

La senescencia nodular se caracteriza por alteraciones tanto en la ultraestructura como en el metabolismo general del nódulo, y muy especialmente en el metabolismo que controla el equilibrio redox en los nódulos.

### 1. Alteraciones ultraestructurales

Los primeros síntomas de senescencia en nódulos de *L. albus* se observan en las células infectadas. En los primeros estadios, el citoplasma de las células aparece denso a los electrones; finalmente, se produce gran proliferación de vesículas y la lisis citoplásmica. Los simbiosomas se fusionan durante el proceso, siendo frecuente la presencia de varios bacteroides por simbiosoma. Posteriormente, los bacteroides aparecen lisados y rodeados por la membrana peribacteroidal. La membrana peribacteroidal permanece aparentemente intacta hasta estadios muy avanzados de senescencia, característica no

observada en otros nódulos. Es interesante destacar la presencia, en nódulos con avanzada senescencia, de numerosos espacios intercelulares repletos de bacterias saprofitas, que podrían servir de reservorio de la cepa nodulante, una vez producido el declive de la actividad fijadora de nitrógeno.

Durante la senescencia, los orgánulos celulares vegetales también sufren alteraciones, especialmente aquellos relacionados con el metabolismo redox como peroxisomas y mitocondrias. Por otra parte, los plastidios, a menudo con abundante contenido de almidón, son los últimos orgánulos que se destruyen cuando tiene lugar la desintegración del tejido nodular infectado, lo que sugiere que pueden jugar un papel importante en la senescencia nodular.

## 2. Antioxidantes y proteínas relacionadas

La fijación de nitrógeno disminuye durante la senescencia y con frecuencia se ha atribuido a la disminución de leghemoglobina. Con anterioridad al efecto de la edad sobre la leghemoglobina, en los nódulos de *Lupinus* se produce un aumento dramático del Fe libre, potente catalizador de la producción de radicales hidroxilo, y probablemente responsable del daño oxidativo a proteínas y lípidos observado. El contenido total de ferritina, proteína almacenadora de hierro en los plastidios, aumenta en los nódulos senescentes de altramu. Mediante técnicas inmunocitoquímicas se demostró que, durante la senescencia, el contenido de ferritina sorprendentemente es escaso en los plastidios y amiloplastos de las células infectadas, mientras que en la corteza, y fundamentalmente en la zona 3, se produce una acumulación de ferritina que forma estructuras cristalinas estables, y por tanto más seguras para el almacenamiento del Fe catalítico. Estos resultados sugieren una función protectora de la corteza para el resto de los tejidos de la planta, frente al Fe libre.

En el envejecimiento de los nódulos de altramu la actividad catalasa disminuye notablemente mientras que la actividad peroxidasa y la actividad específica superóxido dismutasa aumentan significativamente. El nódulo de altramu posee únicamente cinco isoenzimas SOD (tres Cu/Zn-SOD y dos Mn-SOD), de las cuales una Cu/Zn-SOD y las dos Mn-SODs incrementan su actividad durante la senescencia.

En los nódulos de *L. albus*, posteriormente al aumento de Fe catalítico, se detecta disminución del contenido del antioxidante ascorbato y aumento del contenido total de otro metabolito antioxidante, glutatión. Estas alteraciones probablemente se deben a la incapacidad de regeneración del ciclo ascorbato-glutatión. La actividad glutatión reductasa se incrementa durante la senescencia de los nódulos de altramu, mientras que las actividades de las otras enzimas del ciclo son negativamente afectadas, disminuyendo por tanto la capacidad de eliminación del  $H_2O_2$ .

El metabolismo oxidativo por tanto se ve alterado durante la senescencia, desplazando el fino equilibrio redox del nódulo debido a la formación y no suficiente eliminación de las especies reactivas de oxígeno.

## VI. Tolerancia de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* a estreses abióticos

Se ha estudiado el efecto de diferentes concentraciones de  $NO_3^-$  y NaCl. La actividad nitrogenasa decrece, mientras que la resistencia a la difusión de oxígeno aumenta a medida que se incrementa la concentración de estos compuestos. Sin embargo, esta disminución es notablemente menor que en otras leguminosas como *Glycine* o *Phaseolus*. Las técnicas microscópicas e inmunocitoquímicas, junto con el sistema de flujo continuo para la medida de la actividad nitrogenasa y la resistencia a la difusión de oxígeno, han ayudado a comprender el por qué de esta tolerancia. En el caso del nitrato, la capacidad de ajuste de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno no se

altera con la aplicación de nitrato, modificándose exclusivamente la resistencia mínima. El microanálisis de rayos X, junto con la microscopía electrónica de barrido aportan la posible explicación de la resistencia al estrés salino: el bajo nivel de sodio que entra en la zona infectada y la sustitución de iones potasio por iones sodio en la corteza del nódulo.

En cuanto a los herbicidas de diferentes grupos químicos, se ha comprobado que alteran la actividad nitrogenasa, y la ultraestructura de hojas y nódulos, que muestran daños semejantes a los observados en senescencia natural. Además, se producen modificaciones del metabolismo proteico nodular, entre las que cabe destacar la aparición de una nueva proteína de 44 kDa en el patrón proteico de bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) de plantas tratadas con glifosato. Se ha comprobado que está codificada por un único gen cuyos niveles de expresión aumentan a medida que lo hace la concentración del herbicida, indicando que existe una regulación transcripcional. El análisis de la secuencia aminoacídica indica que se trata de una posible porina, siendo ésta la primera porina que se describe en *B. sp.* (*Lupinus*).

Se ha comprobado que *L. albus* también es resistente a determinados metales como el cadmio (Cd) y el zinc (Zn). En el caso del Cd las plantas de altramuza retienen en raíces y nódulos aproximadamente el 88 % del Cd total absorbido. Como con la aplicación de otros estreses, se produce acumulación de glicoproteínas (MAC236) y disminución del contenido de leghemoglobina, por lo que estos parámetros pueden ser considerados indicadores de estrés en *L. albus*. Los resultados sugieren que el lupino ha desarrollado varias estrategias de defensa contra el Cd, como son la alta retención en las paredes celulares y la quelación del Cd por los grupos tioles, lo que contribuye a disminuir la cantidad de Cd libre. Con respecto al Zn, su aplicación produce un descenso en la actividad nitrogenasa y la acumulación de grandes cantidades del metal en raíces, nódulos y parte aérea, indicando que esta planta podría utilizarse para la revegetación de áreas degradadas contaminadas con Zn. Además, *Lupinus* cumple los requisitos necesarios de una buena planta fitorremediadora, como son la gran cantidad de biomasa que produce durante su rápido desarrollo y el bajo coste de cosecha.

## VII. Bibliografía recomendada

- Carpena, R., S. Vázquez, E. Esteban, M. Fernández-Pascual, M.R. de Felipe, y P. Zornoza.** 2003. Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiol. Biochem.* **41**:911-919.
- Cueto, M., O. Hernandez-Perera, R. Martín, M.L. Bentura., J. Rodrigo, S. Lamas, y M.P. Golvano.** 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* **398**:159-164.
- de Lorenzo, C., P.P.M. Iannetta, M. Fernández-Pascual, E.K. James, M.M. Lucas, J.I. Sprent, J.F. Witty, F.R. Minchin, y M.R. de Felipe.** 1993. Oxygen diffusion in lupin nodules. II. Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* **44**:1469-1474.
- de Felipe, M.R., M.M. Lucas, J.P. Lechaire, G. Nicolas, M. Fernández-Pascual, y J.M. Pozuelo.** 1997. Comparative study of two cryotechniques to elucidate real functional aspects of legume nodule development. *J. Plant Physiol.* **150**:428-436.
- de María, N., M.R. de Felipe, y M. Fernández-Pascual.** 2005. Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 985-996.
- Fedorova, E., F.J. Redondo, T. Koshiba, M.R. de Felipe, J.J. Pueyo, y M.M. Lucas.** 2005. Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and

- Medicago truncatula*: Identification of AO in meristematic and infection zones. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:405-413.
- Fernández-Pascual, M., C. de Lorenzo, M.R. de Felipe, S. Rajalakshmi, A.J. Gordon, B.J. Thomas, y F.R. Minchin.** 1996. Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *J. Exp. Bot.* **47**:1709-1716.
- González-Sama, A., M.M. Lucas, M.R. de Felipe, y J.J. Pueyo.** 2004. An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytol.* **163**:371-380.
- González-Sama, A., T. Coba de la Peña, Z. Kevei, P. Mergaert, M.M Lucas, M.R. de Felipe, E. Kondorosi, y J.J. Pueyo.** 2006. Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor Ccs52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. *Mol. Plant Microb. Interact.* **19**:173-180.
- Guasch L.M, M.R. de Felipe, y M. Fernández-Pascual.** 2001. Effect of different O<sub>2</sub> concentrations on nitrogenase activity, respiration and O<sub>2</sub> diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv Multolupa nodules. *J. Plant Physiol.* **158**:1395-1402.
- Hernández-Jiménez, M.J., M.M. Lucas, y M. R. de Felipe.** 2002. Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiol. Biochem.* **40**:645-657.
- Lucas, M.M., G. Van de Sype, D. Hérouart, M.J. Hernández, A. Puppo, y M.R. de Felipe.** 1998. Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma* **204**:61-70.
- Pastor, J., A. J. Hernández, N. Prieto, y M. Fernández-Pascual.** 2003. Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J. Plant Physiol.* **160**:1455-1463.
- Puppo, A., K. Groten, F. Bastian, R. Carzaniga, M. Soussi, M. M. Lucas, M. R. de Felipe, J. Harrison, H. Vanacker, y C.H. Foyer.** 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of natural ageing process. *New Phytol.* **165**:683-701.